



(2000円)

特 許 願

第 1 号

昭和 48 年 8 月 1 日

特 許 庁 長 官 殿

1. 発明の名称 カテコールメチル転移酵素の阻害作用を有する新規イソフラボン化合物の微生物による製造法

2. 発 明 者
住 所 東京都練馬区豊玉北4の23

氏 名 梅 沢 浜 夫

外4名

3. 特許出願人
住 所 東京都品川区上大崎3丁目14番23号

名 称 財団法人微生物化学研究会

代表者 市 川 篤 二

国籍

4. 代 理 人
住 所 〒105 東京都港区西新橋1丁目2番9号
三井物産館内 電話 (591) 0261番 2274

(2400) 氏 名 金 丸 義 男 外4名

① 日本国特許庁

公開特許公報

① 特開昭 50 - 35393

④ 公開日 昭 50. (1975) 4. 4

② 特願昭 48 - 85884

② 出願日 昭 48. (1973) 8. 1

審査請求 未請求 (全12頁)

庁内整理番号 7048 49

7110 49 6910 44

7048 49

⑤ 日本分類

36(2)D521

36(2)D914

36(2)C0

16 E41

⑤ Int. Cl²

C12D 13/10

A61K 37/64

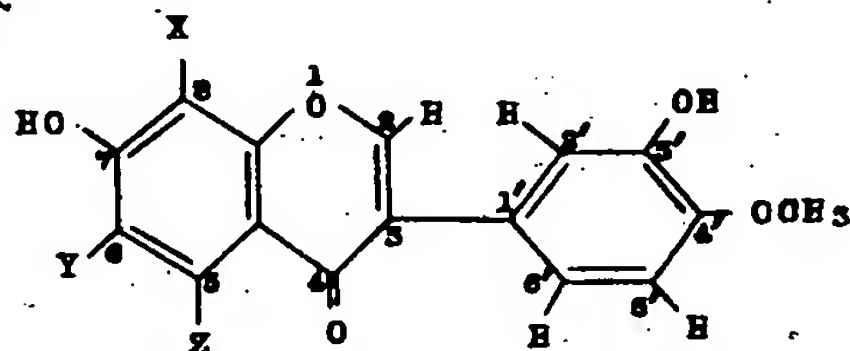
明 細 書

1. 発明の名称

カテコールメチル転移酵素の阻害作用
を有する新規イソフラボン化合物の微生物
による製造法

2. 特許請求の範囲

放線菌に属する新規イソフラボン化合物生産菌
株を好氣的に培養してカテコールメチル転移
酵素を阻害するイソフラボン化合物を生産せしめ、
これを培養物から採取することを特徴とする一般
式

X = H, Y = OOH₃, Z = OH (化合物(I))X = OOH₃, Y = H, Z = OH (化合物(II))X = OOH₃, Y = OOH₃, Z = H (化合物(III))

を有するカテコールメチル転移酵素の阻害作用
を有する新規イソフラボン化合物 (I), (II), (III)
の製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はカテコールメチル転移酵素 (以下
COMTと略記する) の強力な阻害剤である 3',5,7-
トリヒドロキシ-4',6-ジメトキシ-イソ
フラボン (I), 3',5,7-トリヒドロキシ-4',8-
ジメトキシ-イソフラボン (II) 及び 3',7-ジヒ
ドロキシ-4',6,8-トリメトキシ-イソフラ
ボン (III) の製造法、特に微生物を培養して、その
培養物からこれ等の化合物を採取する方法に關す
るものである。

本発明者等はカテコールアミン類のカテコール
骨格のメチル位の水酸基をメチル化する COMT の阻
害物質を系統的に探索し、放線菌の培養液及び菌
体内にその阻害物質の存在をみいだし、これを分
離精製して、化学構造の研究を行い、これ等がイ
ソフラボン骨格を持つ事を見出しさらに化学的
詳細な研究からこれ等は上記 (I), (II), (III) の化学構

造を有する新規化合物である事を明らかにすると共に、微生物を培養して、培養物からこれ等の化合物を採取する方法を発明した。

本発明以前には天然物中にも化学合成物中にも化合物(I)、(II)、(III)は報告されていない。従がつて(I)、(II)、(III)の化合物を採取したのは本発明者等が最初である。

本発明以前にはCOMTの阻害剤は外部より注入されたアドレナリン、ノルアドレナリン等の消失速度を遅らせ、アドレナリン、ノルアドレナリンによる血圧上昇作用の延長及び増強作用を有する事が報告され、又この阻害剤には内在のカテコールアミン類の減少によつて起るとされているウツ病などの病気の治療剤となる可能性が考えられる。さらに分葉病の病因は種々いわれているがその一つに生体アミンの異常メチル化物(カテコールアミン、セロトニンのメチル化物)が脳内で産生することが原因であるとする仮説があり、特に分葉病等における幻覚症状の発現はカテコールアミン類の異常メチル化物によつて起ると云われている。

の事により化合物(I)、(II)、(III)は高血圧症及び動脈硬化症などの病気の治療剤としての可能性及びパーキンソンニスムス症のドーパでの治療に際しての経路薬となり得る可能性などが期待される。さらに化合物(I)、(II)がヒスタジン脱炭酸酵素を阻害する事を発見したがこの事は人の炎症及びアレルギー症の治療薬としての可能性も考えられる。

本発明以前には前記イソフラボン類(I)、(II)、(III)は天然物のなかには存在する事が知られていなかったが本発明者等は放線菌の菌種標準株ISP 5174であるアクチノミセス・ロゼオルス(Actinomyces roseolus); 文献 E.B. Shirling 等, International Journal of Systematic Bacteriology, 18巻, 167頁, 1968年; G.F. Gause, Zur Klassifizierung der Actinomyceten, 28頁, 1958年 (Verlag Gustav Fischer Verlag, Jena) を培養して、培養物から前記化合物(I)、(II)、(III)を収率良く採取する方法を発明した。なお、本菌株を昭和48年2月14日、工業技術院微生物工業技術研究所に保管

(文献; H.E. Himwich, S.B. Kety, J.R.

Smythies; Amines and Schizophrenia, 1967年, Pergamon Press, Oxford)。

そこでCOMTの阻害剤は分葉病及びその幻覚症状の治療剤としての可能性が考えられる。またイソフラボン類の抗溶血作用が村田、池畑等によつて報告され

(Agr. Biol. Chem., vol 32, 740~746, 1968)、さらにコレステロールの蓄を防ぐ事がモールス、モロー、ニユークリス等(G.W.

Moersch, D.F. Morrow, W.A. Neuklis; J. Med. Chem., 10(2), 154~158, 1967)

によつて報告されている。また本発明者等はデビス、アワバラ等(V.E. Davis, J. Awapara;

J. Biol. Chem., 235, 124~127, 1960)

のドーパ脱炭酸酵素の活性の測定法を用いて化合物(I)、(II)、(III)のこの酵素に対する阻害度を測定し、化合物(I)、(II)が強く本酵素を阻害し、化合物(III)は阻害を示さない事を発見した。又化合物(I)、(II)、(III)を高血圧自然発症ラットに投与した時、その血圧を低下させる事を発見した。これ等

委託申請し、微生物寄託番号はオ1906号である。

本発明により、化合物(I)、(II)、(III)はそれを生産する菌株を通常の微生物の培養法として公知の方法で培養して培養物中に生産せしめられる。例えば化合物(I)、(II)、(III)の生産菌アクチノミセス・ロゼオルスは、グリセリン・アスパラギン寒天培地、酵母麦芽寒天培地等の公知の培地に継代培養され、化合物(I)、(II)、(III)の生産のためにこれ等の寒天培地上の発育菌糸を直接生産培地に接種して培養できる。また液体培地に発育せしめた菌体を種母として生産培地に接種して培養し生産せしめる事ができる。

アクチノミセス・ロゼオルスは25°~35℃で発育するがこれ等の化合物の生産には35°~30℃が好ましい。

アクチノミセス・ロゼオルスを培養して化合物(I)、(II)、(III)を生産せしめるためには、カビ、不完全菌、放線菌、細菌などの微生物の培養に公知の栄養源はすべて利用できる。例えばグルコース、

マルトース、ラクトース、サツカロース、グリセリン、デキストリン、澱粉、大豆油、糖蜜等を炭素源として利用できる。大豆粕 2.0 %、酵母エキス 0.5 %、 NaCl 0.25 %、 CaCO_3 0.35 %、

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0005 %、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0005 %、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 %を含む培地を基礎培地として、上記の炭素源を下記の濃度になる様に添加した培地 125 cc を 500 cc 容の坂口フラスコに分注して、120℃で20分間、加圧殺菌し、これにグリセリン・アスパラギン寒天斜面培地に27℃で14日間培養した菌糸を一白金耳接種し、27℃で振盪培養したとき、培養5日目の OOMT の阻害率は下記の様であつた。

上記の様に何れの炭素源もこれらの化合物の生産に利用できるが特にグルコース、澱粉が好適な炭素源である。

化合物 (I)、(II)、(III) の生産のために放線菌、カビ、不完全菌、細菌その他の微生物の発育のために用いられる炭素源はすべて利用できる。例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、大豆粉、大豆粕、コーンステイブリーカー、カザミノ酸、綿実粉等が利用できる。上記の様にグルコース 1 %、澱粉 2 %、 NaCl 0.25 %、 CaCO_3 0.35 %、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0005 %、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0005 %、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 %を含む培地を、下記の濃度になる様に炭素源を添加して殺菌し、これに前記の寒天斜面培地に発育せしめた菌糸を接種して5日間振盪培養したとき、OOMT の阻害率を表記すると次の如くであつた。

炭素源の種類と濃度	pH	希釈率	OOMT 阻害率
マルトース 2%	7.2	×2	25%
グルコース 1% 澱粉 2%	7.2	—	55%
グルコース 2% 大豆油 0.5%	7.2	—	30%
グルコース 1% サツカロース 1%	7.5	—	35%
グルコース 1% 澱粉 1%	7.8	—	35%

炭素源の種類と濃度	pH	希釈率	OOMT 阻害率
グリセリン 2%	8.0	×2	28%
グルコース 2%	7.5	—	33%
ラクトース 2%	7.5	—	20%
デキストリン 2%	7.2	—	30%
澱粉 2%	7.0	—	50%

炭素源の種類と濃度	pH	希釈率	OOMT 阻害率
大豆粕 2.0% コーンステイブリーカー 0.5%	7.8	×2	58.0%
綿実粉 2.0%	7.8	—	48.0%
綿実粉 2.0% 酵母エキス 0.5%	7.5	—	51.0%
綿実粉 2.0% カザミノ酸 0.5%	7.8	—	50.0%
綿実粉 2.0% コーンステイブリーカー 0.5%	7.8	—	50.0%

炭素源の種類と濃度	pH	希釈率	OOMT 阻害率
肉エキス 0.75% ペプトン 0.75%	7.8	×2	18.0%
大豆粕 2.0% 酵母エキス 0.5%	7.5	—	58.0%
大豆粉 2.0% (アロシナ)	7.5	—	48.0%
大豆粉 2.0% (エグザンシト)	7.8	—	45.0%
大豆粕 2.0% カザミノ酸 0.5%	7.2	—	60.0%

上記の様に何れの培養源も利用できるが、大豆粕、酵母エキスが好適な培養源であつた。

化合物(I), (II), (III)を生産せしめるために必要とするならば無機塩、金属塩、重金属塩の量を加える。又培養液中、培養中に消泡を必要とする時はシリコン樹脂、大豆油、アデカノール等の消泡剤を使用できる。

化合物(I), (II), (III)は生産菌アクチノミセス・ロゼオルスを経気的に培養して得られるが、ペニシリン等の抗生物質の生産のために用いられる通気攪拌タンク培養法がその主本発明に用いられる。また化合物(I), (II), (III)の培養液中での濃度は以上に掲げた培養での諸条件によつて異なる事は専門家に於て公知の事実である。したがつて菌株の改良、培養条件の選択によつて単一の化合物のみを生産せしめる事、特定の化合物を合理的に生産せしめる事は専門家に於て容易な事である。この発明はそれ等のすべての修飾方法をも包括するものである。

化合物(I), (II), (III)はO B M Tの阻害によつて定

阻害度を求める。

また化合物(I), (II), 及び(III)はヒスタジン脱炭酸酵素も阻害するが、その阻害活性は次の方法で測定される。すなわち反応組成はL-ヒスタジン- $2-^{14}C$ (1.0×10^6 cpm) の 2.5×10^{-6} モル、ピリドキサルリン酸 (3.7×10^{-5} モル)、ヒスタジン脱炭酸酵素 (蛋白質量 1 mg/ml) 0.1 cc、0.67 モルリン酸緩衝液 (pH 6.8) 0.1 cc、試料溶液を加えて蒸留水で全量を 1 cc とする。この反応液を 37°C、2 時間反応後、生成するヒスタミン- $2-^{14}C$ をアンバーライト 00-50 のアンモニヤ型に吸着させ、水洗後 1 規定アンモニヤ水で吸着したヒスタミンを溶出させ、溶出液を一定量取り放射能活性を液体シンチレーションカウンターで測定し、生成したヒスタミン量を測定してその阻害度を求める。

次に化合物(I), (II), (III)の抽出精製について記述する。これ等の化合物はアルカリ性の水、メタノール、エタノール、アセトン等の溶剤に溶け、ブタノール、酢酸エチル、酢酸ブチル等にも僅かに溶

量できる。O B M T の活性はニコデジエビック等が報告した方法に準じて測定される (文献; B. Nikodejevic 等, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics; vol 174, 83~93 頁, 1970 年)。反応液の組成は水 0.125 cc、0.1 モル・リン酸緩衝液 (pH 8.0) 0.05 cc、0.1 モル・塩化マグネシウム溶液 0.1 cc、0.05 モル・アドレナリン溶液 0.05 cc、0.5 ミリモル・トリチウム-8-アデノシルメチオニン水溶液 (2.2×10^6 cpm) 0.075 cc、試料溶液 0.05 cc、酵素溶液 0.05 cc で総容量 0.5 cc である。上記の溶液を 0°C で混合し、37°C で 20 分間反応させた後 0.5 モルのリン酸緩衝液 (pH 10.0) を 1 cc 加えて反応を止め、基質アドレナリンのメタ位の水酸基がメチル化されたトリチウムメタネフリン (3H -metanephrine) をトルエン-イソアミルアルコール (3:2) の混合溶媒で抽出し、溶媒部を一定量取り、液体シンチレーションカウンターで放射能活性を測定し、それより生成したメタネフリン量を測定し、その

解する。これ等の化合物は培養液から酸性でブタノール、酢酸ブチル等に抽出され、菌体固形部からはメタノール、アセトン等で抽出される。この菌体固形部からの抽出液は減圧蒸留によつて濃縮され、濃縮液は酸性に調整後酢酸ブチル、ブタノール等によつて抽出され、培養液内から抽出された酢酸ブチル、ブタノール等の溶液と混合して減圧濃縮乾固する。

上記の様にして得た抽出乾固物は石油エーテル、ノルマルヘキサン等で処理すると(I), (II), (III)の化合物は共に不溶部に移行する。さらにこの不溶部をアセトンで抽出すると溶媒層に活性部が移行し、残渣は不純物として除かれる。このアセトン抽出液を減圧濃縮乾固し、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、ベンゼン:アセトン (10:1) で溶出すると活性の強い三個のフラクションに分離される。さらに各々の活性部の活性物質はセフアデプタス LB-80 を用いたカラムクロマトグラフィー、アルミナを用いたカラムクロマトグラフィー、必要時はシリカゲルの再ク

ロマトグラフィーによつて精製され、最初の活性フラクションからは化合物(I)、2番目からは化合物(II)、最後のフラクションからは化合物(III)が各々結晶として単離される。

これ等の化合物の理化学的性質は下記の表1のごとくであり、さらに詳細な化学構造の研究の結果、化合物(I)は3',5,7-トリヒドロキシ-4',8-ジメトキシ-イソフラボン、化合物(II)は3',5,7-トリヒドロキシ-4',8-ジメトキシ-イソフラボン、化合物(III)は3',7-ジヒドロキシ-4',6,8-トリメトキシ-イソフラボンであると本発明者等は決定した。

表 1

理 化 学 的 性 状	I	II	III
性 状 (融 点)	淡黄色針状 (176°)	黄色針状 (180°)	無色針状 (215°)
元 素 分 析 値 (%)	C:61.92, H:4.31, O:33.28	C:61.63, H:4.50, O:34.31	C:62.86, H:4.79, O:32.35
マ ス ス ペ ク ト ル	530	530	344
分子式 (分子量) と 理 論 値	C ₁₇ H ₁₄ O ₇ (330.28) C:61.82, H:4.27, O:33.91	C ₁₇ H ₁₄ O ₇ (330.28) C:61.82, H:4.27, O:33.91	C ₁₆ H ₁₀ O ₇ (344.31) C:62.97, H:4.68, O:32.53
塩 化 銅 と 鉄 反 応	⊕ 紫青色	⊕ 紫青色	⊕
ギ ッ プ ス の 反 応	紫 色	黄 紫 色	青 色
-OH の 数 (NMR から)	2	2	3
アセチル基の導入数 (NMR から)	3	3	2
紫 外 吸 収 (λ _{max}) ① エタノール ② エタノール (塩化アルミ) ③ Me ₂ SO 飽和エタノール	1) 269.0nm (log ε: 4.305), 295nm (ε) 2) 284.0nm (log ε: 4.301), — 3) 278.0nm (log ε: 4.307), 340nm (ε)	1) 269.0nm (log ε: 4.312), 295nm (ε) 2) 285.0nm (log ε: 4.320) 3) 279.0nm (log ε: 4.310)	1) 268.0nm (log ε: 4.314), 295nm (ε) 2) 288.0nm (log ε: 4.316), 295nm (ε) 3) 285 nm (log ε: 4.310) —
赤 外 吸 収 スペ ク ト ル (cm ⁻¹)	3500 1655 1630 1585 1520 1478 1380 1300 1265 1200 1175 1130 1070 1028 1000 970 905 875 830 815 755 732 675	3450 1655 1620 1580 1515 1435 1370 1310 1270 1195 1170 1130 1065 1030 994 945 905 880 825 810 755 725 675	3500 1650(ε) 1615 1580 1515 1475 1355 1310 1300 1270 1210 1195 1130 1100 1080 1025 1000 985 960 900 865 805 785 750 710
NMR (DMSO-d ₆) 100MHz (ppm)	13.80(OH):s 10.74(OH):M 9.05(OH):M 8.33(H):s 7.05(H) } アロマチックプロトン 6.97(2H) } 6.52(H):s, アロマチックプロトン 4.78(3H):s OCH ₃ 4.82(3H):s OCH ₃	12.63(OH):s 10.75(OH):M 9.04(OH):M 8.40(H):s 7.06(H) } アロマチックプロトン 6.97(2H) } 6.33(H):s, アロマチックプロトン 3.78(3H):s OCH ₃ 3.81(3H):s OCH ₃	10.00(OH):M 9.00(OH):M 8.39(H):s 7.07(H+H) } アロマチックプロトン 6.98(2H) } 3.90(3H):s OCH ₃ 3.83(3H):s OCH ₃ 3.81(3H):s OCH ₃
薄 層 ク ロ マ ト (シリカゲル) 1) ベンゼン:アセトン(5:1) 2) クロロホルム:メタノール(40:1) 3) ベンゼン:酢酸エチル(1:1)	1) 0.30 2) 0.50 3) 0.65	1) 0.25 2) 0.31 3) 0.60	1) 0.19 2) 0.31 3) 0.80

次に化合物(I)・(II)・(III)の生物学的性状について記述する。化合物(I)・(II)・(III)の毒性は25%ジメチルスルホキシド水溶液に溶解して、マウスの腹腔内に投与したとき200mg/Kgで毒性を示さなかつた。

前述の測定法でOOMT活性の50%阻害の濃度を求めると化合物(I)は0.5 r/α (1.515×10^{-6} モル)、化合物(II)は5.0 r/α (1.515×10^{-6} モル)、化合物(III)は0.2 r/α (5.80×10^{-7} モル)であつた。なおこれ等の物質は本発明者等が記載した方法でチロシン水酸化酵素(J. Antibiotics, 21, 350, 1968)及びドーパミン水酸化酵素(J. Antibiotics, 21, 354, 1968)の阻害活性を測定したが100 r/αでそれ等の酵素の阻害作用は認められなかつた。さらに前記の方法でドーパ脱炭酸酵素の阻害を調べると化合物(I)は12.5 r/α (3.79×10^{-6} モル)、化合物(II)は5.0 r/α (1.515×10^{-6} モル)で50%の阻害率を示したが化合物(III)は100 r/αで阻害を示さなかつた。又前述の測

16.3%、12.5 mg/Kgの投与で1時間後10.4%、3時間後34.4%、6時間後32.8%、24時間後18.0%、48時間後18.0%、3.1 mg/Kgの投与で1時間後21.0%、3時間後26.3%、6時間後28.0%、24時間後22.0%、48時間後13.4%の血圧降下作用を示した。化合物(II)では50 mg/Kgの投与で1時間後11.9%、3時間後13.0%、6時間後17.3%、24時間後7.0%、48時間後、3.8%の弱い血圧降下作用を示した。

以下、本発明によるイソフラボン類の新規化合物(I)・(II)・(III)の製造法の実施例を示すが、本発明により化合物(I)・(II)・(III)が微生物で造られる事が明らかにされたのでこの明細書に記された知見に基づいて、本明細書に記された方法を修飾した方法が容易に設定される。本発明者等が微生物が造る酵素阻害物質の系統的研究で示した様に、酵素阻害物質の生産は特定の菌種に限らない。かくして本発明で放線菌の一株による化合物(I)・(II)・(III)の生産が明らかにされたので放線菌の他の菌種を

定法でヒスチジン脱炭酸酵素の阻害を調べると化合物(I)は6.0 r/α (1.8×10^{-6} モル)、化合物(II)は1.5 r/α (4.5×10^{-6} モル)で50%の阻害率を示したが、化合物(III)は10.0 r/αの濃度で約31.9%の弱い阻害率を示した。上記のようは化合物(III)は他の酵素の阻害活性を示さずOOMTのみに阻害活性を示す極めて特異的な化合物である。

化合物(I)・(II)・(III)は100 r/αで細菌類、カビ類に対して発育阻止作用を示さなかつた。

又化合物(I)・(II)・(III)を高血圧自然発症ラットの腹腔内に投与し、その血圧降下作用を調べた結果の1例を示すと化合物(I)では50 mg/Kgの投与で1時間後20.8%、3時間後16.4%、6時間後35.0%、24時間後3.8%、12.5 mg/Kgの投与で1時間後13.6%、3時間後10.7%、6時間後15.8%、24時間後7.8%の血圧降下作用を示した。化合物(II)は50 mg/Kgの投与で1時間後22.5%、3時間後35.9%、6時間後35.5%、24時間後25.9%、48時間後

用いて生産せしめる事は専門家にとって容易な事でさる。

本発明はそのすべての修飾方法をも包括し、実施例はその例示で、本発明は実施例に限定されるものではない。

実施例 1

化合物(I)・(II)・(III)を生産する放線菌アクチノミセス・ロゼオルスをグリセリン・アスパラギン寒天斜面培地に14日間生育させ、その気菌糸から一白金耳量を、大豆粕2%、グルコース1%、澱粉2%、 NaCl 0.25%、 CaCO_3 0.35%、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0005%、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0005%、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005% を含む培地を殺菌前PH 7.4に修正して、125α宛、500αの坂口コルベンに分注し、120℃、20分間殺菌した培地に接種し、27℃で毎分130往復の振盪機で5日間培養した。PHは植菌前7.0、2日後6.2、3日後6.4、4日後6.8、5日後7.2であつた。培養中の残糖はペルトラン法で還元糖を分析すると、2日後で

2.85%、3日後で1.00%、4日後で0.55%、5日後で0.25%であつた。この培養液5000ccをろ過して母液4000ccを得た。この母液のCOMT阻害活性は2倍に希釈して64%の阻害率を示した。この4000ccの母液を2N-HClでpH 2.00に修正し4000ccの酢酸ブチルで抽出し(収率80%)、抽出液を外温40℃で減圧濃縮乾固すると18.5gの赤褐色のシラップ状物質が得られ、さらに石油エーテル1000ccで処理すると7.5gの石油エーテル不溶部が得られ、このCOMTの阻害活性は250%で50%の阻害率を示し、石油エーテル可溶部はほとんど阻害率を示さなかつた。得られた石油エーテル不溶部をアセトン100ccに溶解させて不溶部を除き、30gのマリンクロット社製のシリカゲル(AR-100~200メッシュ)をアセトン溶液中に加えて減圧濃縮乾固させ、ベンゼン:アセトン(10:1)の溶媒系でシリカゲル(前記マリンクロット社製)300gをゲル化させ5×80cmのカラムに充填したカラムを用いて、

ジャーファーマンター(4基分)の培養液45ℓをバスケット型の遠心分離機で毎分2500回転で遠心分離を行い、母液40ℓ、菌体固形部5kgが得られ、菌体固形部は5ℓのメタノールで抽出するとメタノール溶液4.8ℓが得られた(母液はX₂で50%、メタノール抽出液はX₄で50%のCOMTの阻害率)。メタノール抽出液を500ccまで減圧濃縮し、母液と合せて6N-HClでpH 2.0とし実施例1と同様の比率で酢酸ブチル抽出を行い、抽出層を減圧濃縮乾固すると80.0gの油状物質が得られ、さらに石油エーテル4.0ℓで処理すると石油エーテル不溶部は35.0gの褐色の粉末が得られ、この粉末の活性は全体の85%であつた。この粉末を実施例1で示した方法の3倍の比率で、実施例1と同様にカラムクロマトグラフィーを行い最初の活性部からは790mgの黄色粉末、2番目からは250mgの黄色粉末、3番目からは150mgの褐色の粉末が得られた。これらの粉末のCOMTの50%阻害濃度は各々20%, 50%, 20%であつた。

その上端に乾燥物を施置させ、前記の溶媒系でカラムクロマトグラフィーを行うと活性部が3個のフラクションに成つて溶出され、最初のフラクション750ccを濃縮乾固すると淡黄色の粉末58.0mgが、2番目のフラクション1000ccからは黄色の粉末24.0mgが、最後のフラクション1500ccからは12.5mgの褐色の粉末が得られた。これらの粉末の酵素阻害活性は各々50%, 78%, 5%で50%の阻害率を示した。

実施例 2

実施例1と同様な方法で培地を調整し、同様の方法で振盪培養を行い、培養3日目の培養液500ccを、実施例1と同組成の培地を30ℓ容のジャーファーマンターに12ℓ宛仕込み、120℃、30分間高熱蒸気で殺菌し、シリコン樹脂を約1.2cc添加して消泡し、ジャーファーマンター1基につき接種する。27℃で105時間、殺菌空気を毎分12ℓ通気し、毎分250回転の攪拌機で攪拌しながら、発泡した時はシリコン樹脂を加えながら培養を続けた。この様にして得たジ

さらに最初の活性部をメタノール10ccに溶解させセフアデックスLH-20(500cc)のカラムクロマトグラフィー、メタノール溶出法で活性部は1つのピークと成り1500にまよつて溶出された。この活性フラクションを減圧濃縮乾固後、アセトン5ccに溶解させた後ノルマルヘキサン20ccを加えて一夜室温に放置すると化合物Iの淡黄色針状結晶が18.5mg得られ、さらに再結晶化で15.0mgの純粋な化合物(I)が得られた。2番目の活性部も同様にセフアデックスLH-20のクロマトグラフィーで不純物を除き、さらに4ccのベンゼンを加えて60℃に加温して溶解させ一夜室温に放置すると20mgの黄色の粗結晶が得られ、同様な方法で再結晶化を行い18.2mgの化合物(II)の淡黄色針状結晶が得られた。

3番目の活性部は重量の3倍量のアルミナ(ヴェールム社・中性化アルミナ)をメタノールでカラムに充填し、メタノールで溶解させた活性部を通過させると色素だけがアルミナに吸着され無色と成る。この通過液をセフアデックスLH-20

のクロマトグラフィーを行い1番目の活性部と同様に処理すると11.5 μ の化合物(III)の無色針状結晶が得られた。

実施例 3

タンクによる培養は実施例1と同様にして培養した種母を第1次種母とし、実施例2と同様にして培養した種母を第2次種母として、200 μ 容のステンレス・スチール製のタンクに、実施例1、2と同様な培地を120 μ 宛仕込み120 $^{\circ}$ Cで30分間、高熱蒸気で殺菌し、シリコン樹脂を0.01%添加後、第2次種母を5 μ 宛接種し、毎分120 μ の殺菌空気を通気し、毎分200回転で攪拌し、27 $^{\circ}$ Cで96時間培養した。

この培養液(タンク2基分)240 μ をフィルター・プレスで濾過し、濾液200 μ 、菌体固形部40 μ を得た。菌体固形部は80 μ のメタノールで抽出し、メタノール抽出液70 μ を得た。濾液は3倍に希釈して50%の阻害率を示し、メタノール抽出液は8倍に希釈して50%の阻害率を示した。これらの濾液及びメタノール抽出液は実

施例2と同様の比率で同様に抽出精製、結晶化を行い化合物(I)の結晶335 μ 、化合物(II)の結晶180 μ 、化合物(III)の結晶78 μ を得た。

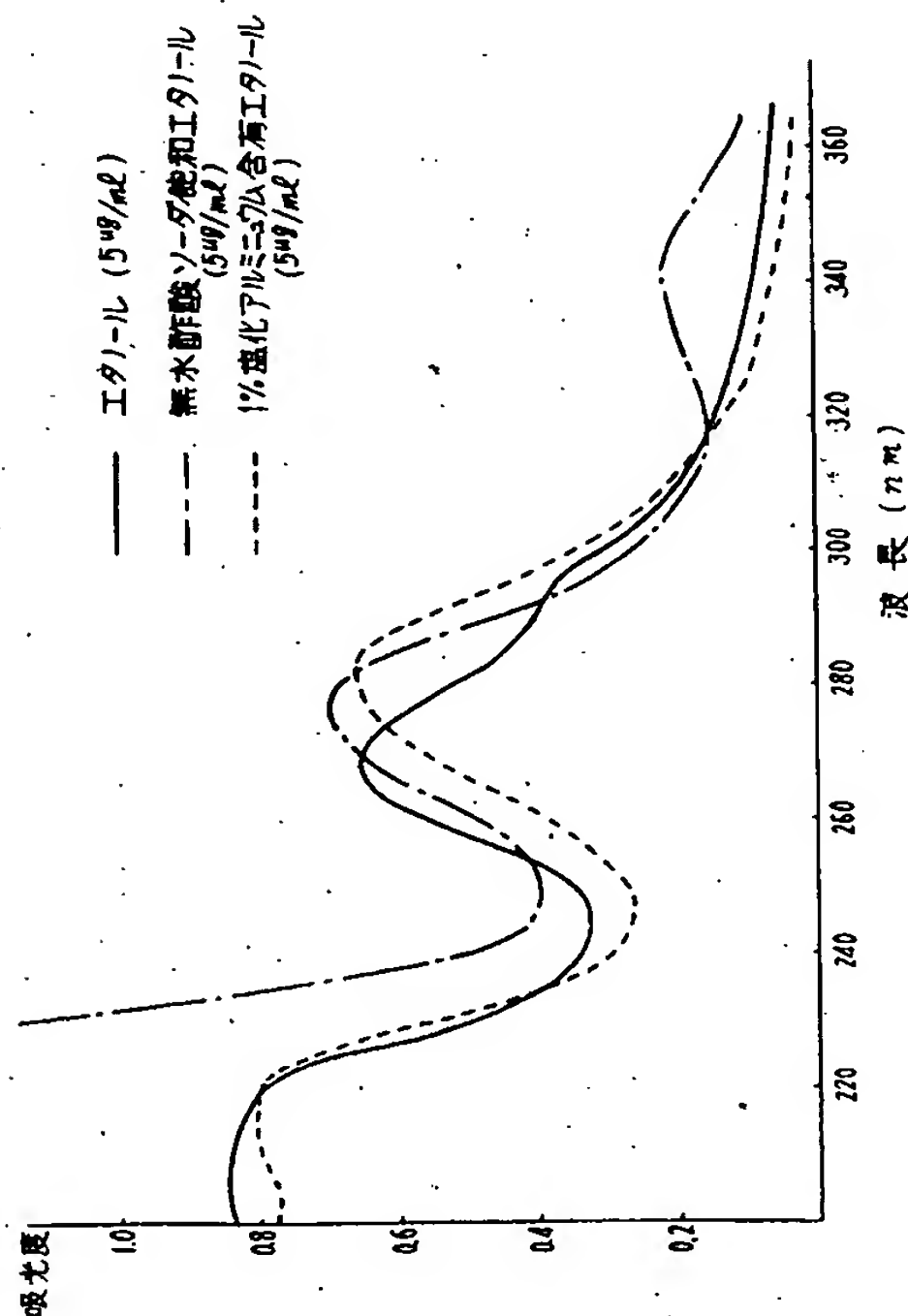
4. 図面の簡単な説明

第1図、第2図、第3図は化合物(I)、(II)、(III)の5 μ / α の純エタノール溶液、無水酢酸ソーダ飽和エタノール溶液、1%塩化アルミニウム含有エタノール溶液中での夫々の紫外線吸収スペクトル曲線を示す。

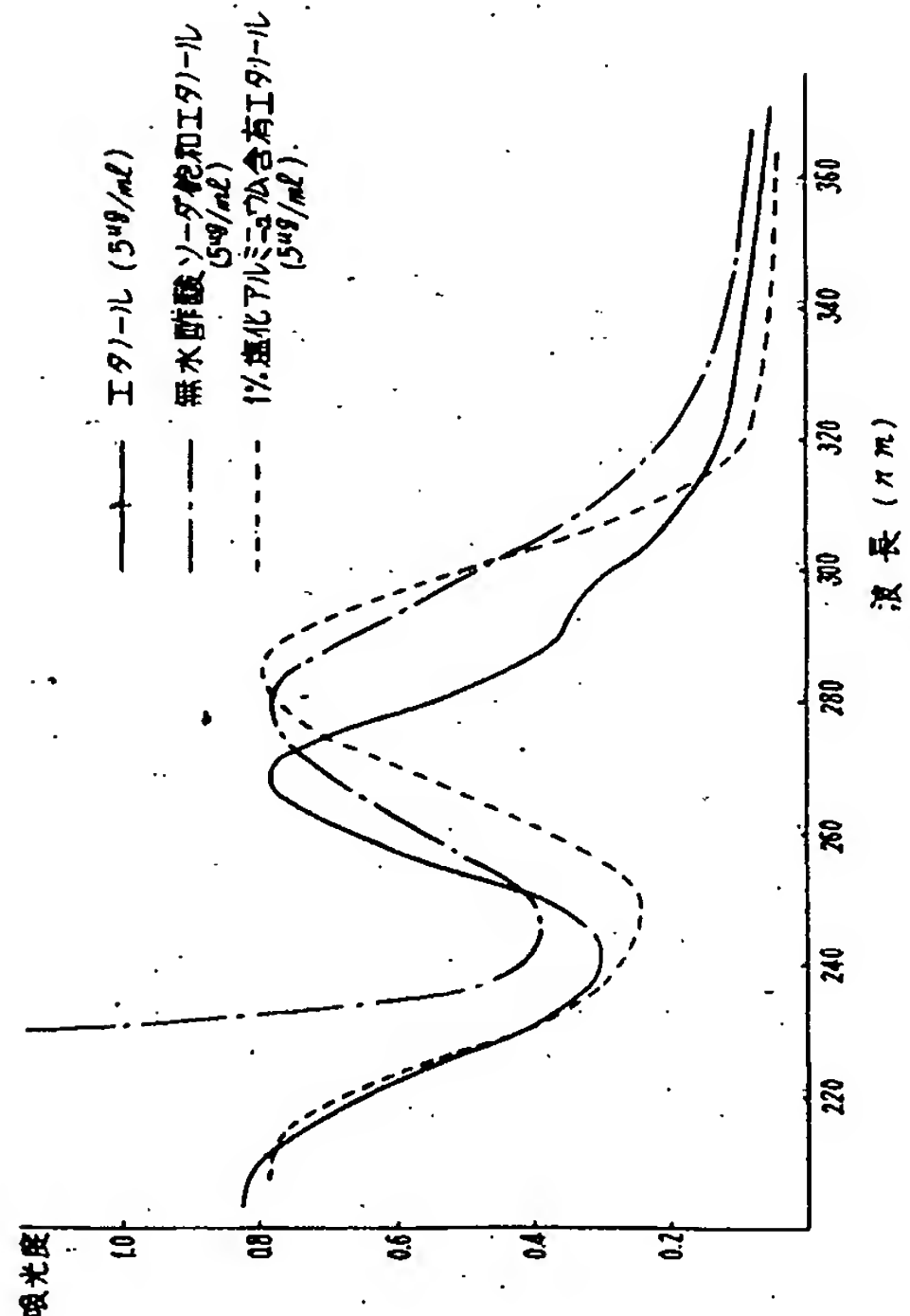
第4図、第5図、第6図は化合物(I)、(II)、(III)を臭化カリウムとして測定した夫々の赤外線吸収スペクトル曲線を示す。

代理人	金	丸	義	男
同	朝	内	忠	夫
同	八	木	田	茂
同	浜	野	孝	雄
同	森	田	哲	二

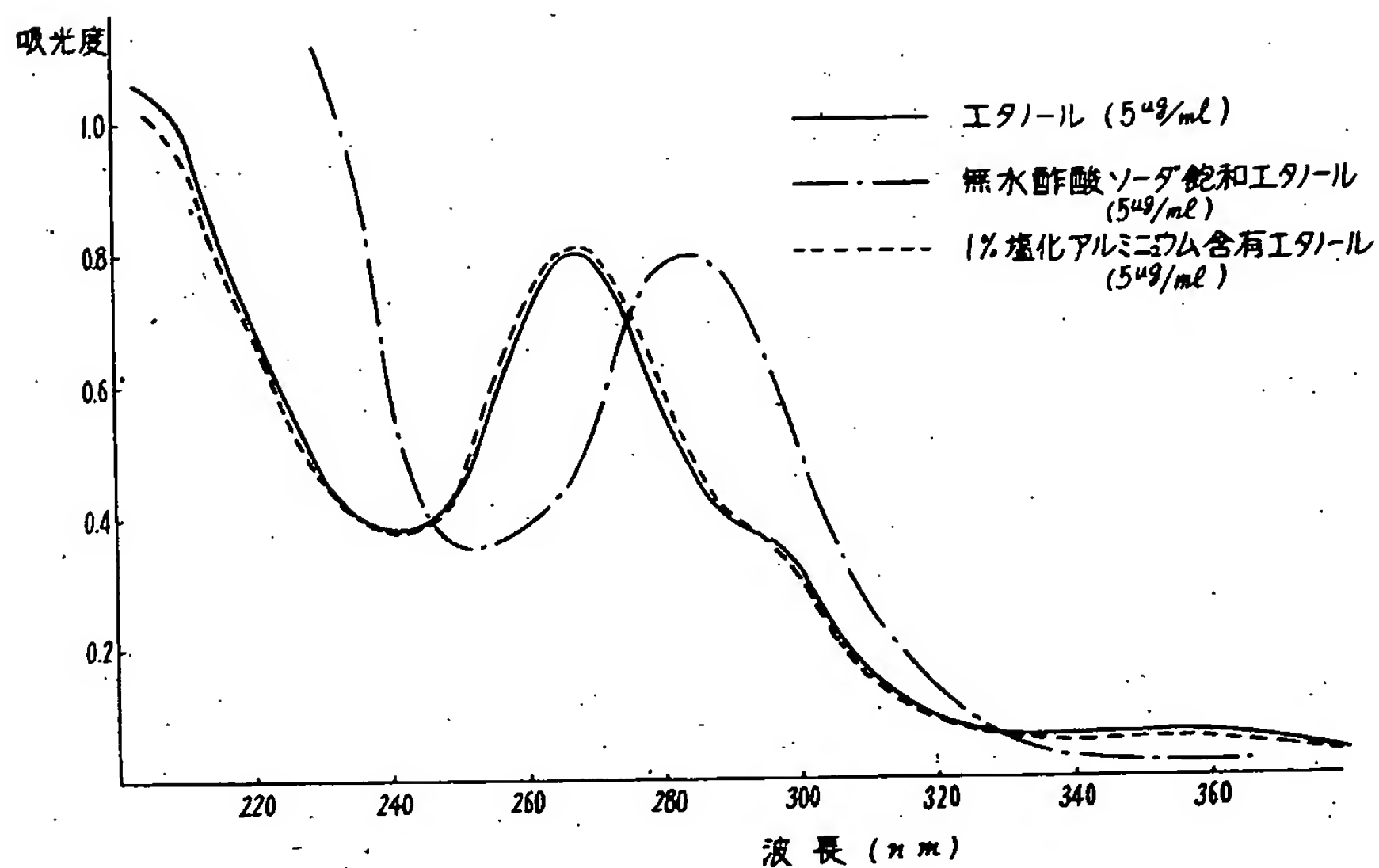
第1図



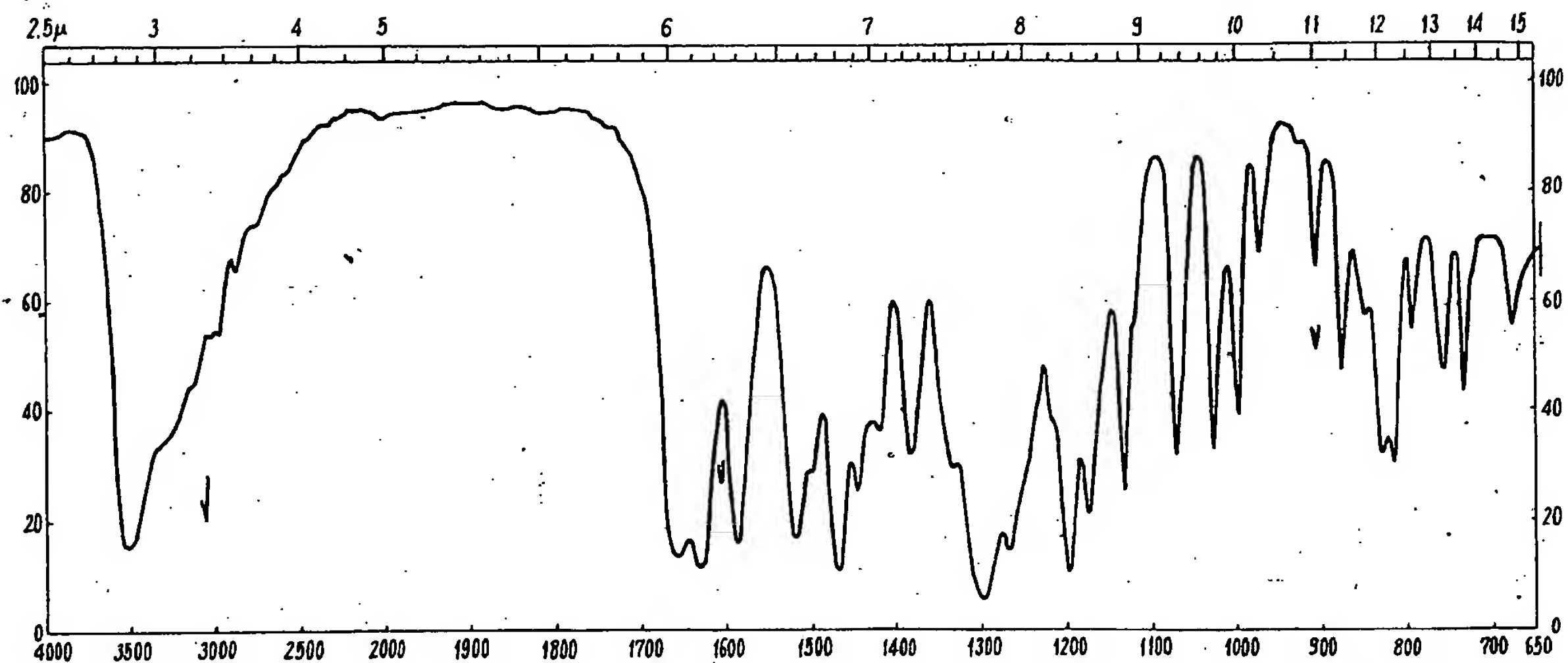
第2図



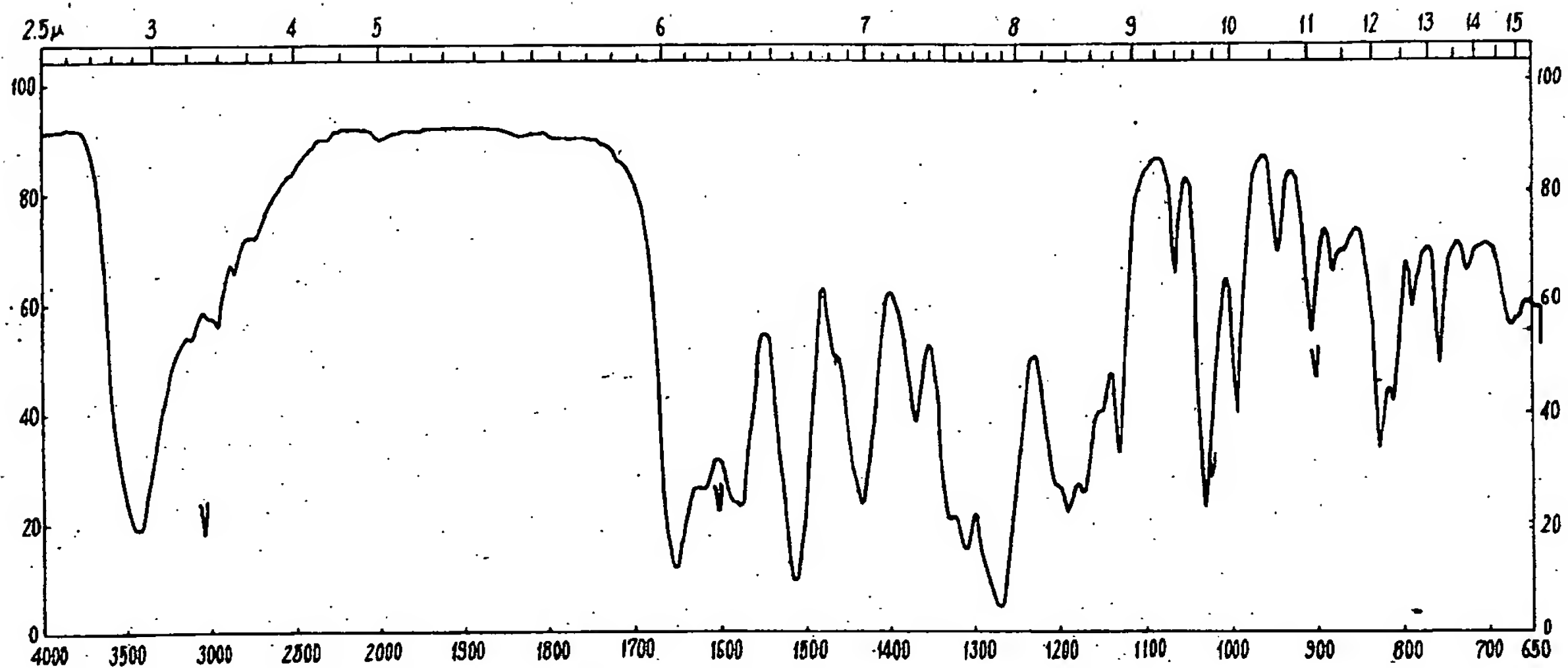
第3図



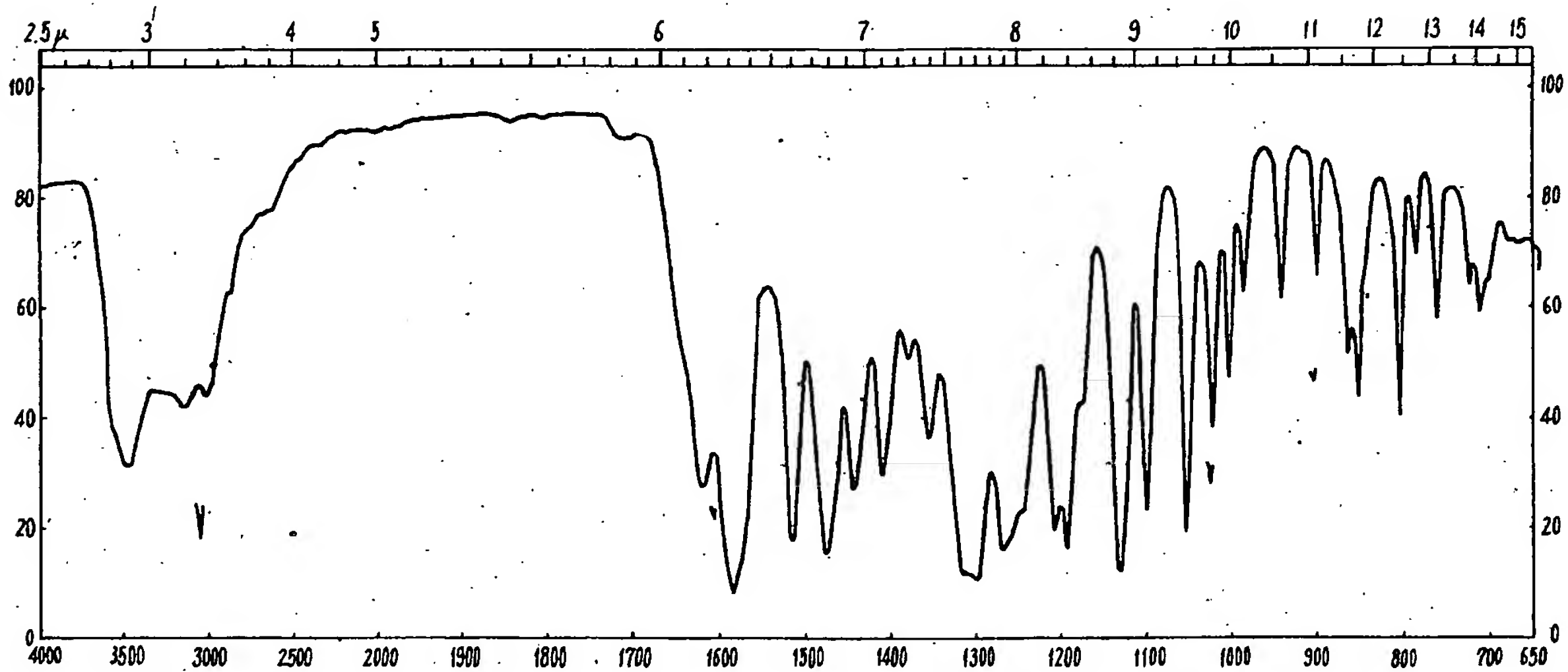
第4図



第5図



第6図



5. 添附書類の目録

- (1) 明細書 1 通
 (2) 図面 1 通
 (3) 委任状 1 通
 (4) 微生物受託番号通知書 1 通

(2) 代理人

住所 東京都港区西新橋1丁目2番9号
 三井物産館内

氏名 朝内 忠夫

同所 八木田 茂

同所 浜野 孝雄

同所 森田 哲二

6. 前記以外の発明者、代理人

(1) 発明者

住所 東京都品川区東五反田5丁目1番11号
 ニューフジマンション701-A

氏名 竹内 富雄

住所 東京都北区志茂3の17の1

氏名 千村 秀夫

住所 神奈川県高座郡綾瀬町吉岡1826-51

氏名 沢 力

住所 東京都保谷市富士町1丁目7番3号の4

氏名 浜田 雅

2309

手続補正書 (自発)

昭和 48 年 11 月 12 日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和 48 年 特 許 願 第 85884 号

2. 発明の名称

カテコールオ-メチル転移酵素の阻害作用を有する
 新規イソフラボン化合物の微生物による製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都品川区上大崎3丁目14番23号

財団法人微生物化学研究会

4. 代理人

住所 東京都港区西新橋1丁目2番9号、三井物産館内

(2400) 氏名 金丸 義男

5. 補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄

6. 補正の内容

- (1) 明細書第4頁第8行「コレステロールの着
 を」を「コレステロールの沈着を」と補正す
 る。
- (2) 同 第6頁第1行「微生物寄託番号は第
 1906号」を「微生物受託番号は農工研菌寄
 第1906号」と補正する。
- (3) 同 第7頁第4行「Nacl」を「NaCl」と
 補正する。
- (4) 同 第12頁第1行「CSMT」を「COMT」
 と補正する。
- (5) 同 第16頁表1中化合物Iの欄の上か
 ら9列目「紫外線吸収」の列の
 「1) 249.0 nm ($\log \epsilon$: 4.305), 295 nm
 (S)
 2) 284.0 nm ($\log \epsilon$: 4.301), -
 3) 298.0 nm ($\log \epsilon$: 4.307), 340 nm
 (S)」を
 「1) 249.0 nm ($\log \epsilon$: 4.305) 295 nm (S)

2) 284.0 nm ($\log \epsilon$: 4.301)

3) 278.0 nm ($\log \epsilon$: 4.307) 340 nm(S)

と補正し、次の

「赤外吸収スペクトル」の列の第1行目*番目の「1585」を「1580」と補正し、次の「NMR (DMSO-d₆)」の列の下から2行目「OCH₃」を「OCH₃」と補正する。更に

表1中化合物IIの欄の上から9列目「紫外線吸収」の列の3)の行の右端の「-」を削除し、次の「赤外吸収スペクトル」の列の最下位行の「865」の次に「854」を加える。

(6) 同 第17頁第7行「0.5 r / ∞ (1.515 x)」を「0.7 r / ∞ (2.11 x)」と補正し

(7) 同 同 第8~9行「3.0 r / ∞ (1.515 x 10⁻⁶モル)」を「2.0 r / ∞ (4.00 x 10⁻⁶モル)」と補正する。

(8) 同 第18頁第6行「上記のようほ」を「上記のように」と補正する。

(9) 同 同 下から第4行「7.8 %」を「7.9 %」と補正する。

(10) 同 第20頁第2行「でさる。」を「である。」と補正する。

(11) 同 第24頁第4行「1500」を「1500」と補正する。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.